



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap**

Bovin freemartinism

Bovine freemartinism

Amanda Hammarström

*Uppsala
2019*

Bovin freemartinism

Bovine freemartinism

Amanda Hammarström

Handledare: *Elisabeth Persson, Sveriges lantbruksuniversitet,
institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

Examinator: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet,
institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

Kursansvarig institution: *Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *freemartinism, chimerism, bovin, reproduktion*

Key words: *freemartinism, chimerism, bovine, reproduction*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	4
Köns reproduktionsorgan.....	4
<i>Ovarium</i>	4
<i>Tuba uterina</i>	4
<i>Uterus och cervix</i>	4
<i>Vagina och vestibulum</i>	5
<i>Vulva</i>	5
Normal könsutveckling.....	5
<i>Hanlig könsutveckling</i>	6
<i>Honlig könsutveckling</i>	7
Freemartinism.....	8
<i>Definition</i>	8
<i>Uppkomst</i>	8
<i>Anatomiska förändringar</i>	10
<i>Effekter på hankalven</i>	13
Multipla ovulationer och mjölkavkastning.....	13
Behov av diagnostiska metoder.....	14
Diskussion.....	15
Litteraturförteckning	17

SAMMANFATTNING

Denna litteraturstudie syftar till att beskriva den normala könsutvecklingen hos nötkreatur och jämföra framförallt den honliga utvecklingen med den som sker hos freemartinfoster samt redogöra för anatomiska förändringar som uppkommer vid freemartinism. Ytterligare områden som kommer belysas är samband mellan multipla ovulationer och mjölkavkastning samt behov av diagnostiska metoder för att identifiera freemartinism.

Freemartinism är den vanligaste formen av intersexualitet hos nöt. En freemartinkviga definieras generellt som en steril honkalv, med varierande grad av maskuliniserade reproduktionsorgan, tvillingfödd med en hankalv. Hos freemartinkvigor är det framförallt en modifiering av de inre reproduktionsorganen som ses, medan de yttre ofta bibehåller en mer honlig karaktär.

Under en tvillingdräktighet där fostren är av motsatt kön krävs det att vaskulära anastomoser etableras mellan fosterhinnorna för att fostren ska få en gemensam cirkulation. Den honliga könsutvecklingen inhiberas och modifieras då hanliga könshormon överförs från hankalven till honkalven och en gemensam cirkulation är därmed en förutsättning för att freemartinism ska uppstå.

De hanliga hormonerna AMH (Anti-Müllerian Hormone) och testosteron orsakar bland annat tillbakabildning av de müllerska gångarna och utveckling av de wolffska gångarna, vilket leder könsutvecklingen hos freemartinfostret i en hanlig riktning. Variationen i grad av reproduktionsorganens maskulinisering beror på hur tidigt de vaskulära anastomoserna etableras och därmed i vilket stadium i könsutvecklingen som de hanliga hormonerna överförs till honan.

Hos nöt är tvillingdräktigheter vanligast till följd av multipla ovulationer, ett fenomen som visats vara associerat till hög mjölkavkastning hos mjölkkor. En ökad steroidmetabolism, associerad med högre mjölkavkastning och foderförbrukning hos mjölkkor, kan ligga bakom en hormonell rubbning som leder till ökad förekomst av multipla ovulationer.

I cirka 10 % av fallen med tvillingdräktighet hos nöt där fostren är av motsatt kön är honkalven fertil, vilket bland annat kan bero på att vaskulära anastomoser aldrig etablerats mellan fosterhinnorna och fostren har således inte haft en gemensam cirkulation. Djurägare tenderar att avliva honkalvar tvillingfödda med en hankalv på grund av antagandet att de är sterila och i brist på effektiva och praktiskt användbara diagnostiska metoder för att identifiera freemartinkvigor. Till följd av detta sker ekonomiska och genetiska förluster för djurägarna och därmed finns det ett ökat behov av praktiskt användbara metoder för diagnostik av freemartinism. Mer forskning krävs för framtagandet av en effektiv, snabb och säker diagnostisk metod som djurägare kan nyttja.

SUMMARY

The aims of this review was to describe the normal sexual development in cattle and, above all, compare the female sexual development with that of freemartins and account for anatomical changes that occur during freemartinism. Further areas that will be highlighted are relationships between multiple ovulations and milk yields and the need for diagnostic methods to identify freemartins.

Freemartinism is the most common form of intersexuality in cattle. A freemartin is generally defined as a sterile female calf, with varying degrees of male-modified reproductive organs, twin-born with a male calf. In freemartins, there is most commonly a modification of the internal reproductive organs while the external genitalia often retain a more feminine character.

During a twin pregnancy with dizygotic fetuses, a formation of vascular anastomoses is required between the fetal membranes in order for the fetuses to have a common circulation. The female sexual development is inhibited and modified when male sex hormones are transferred from the male calf to the female calf and a common circulation is thus a prerequisite for freemartinism to arise.

The male hormone AMH (Anti-Müllerian Hormone) and testosterone cause, among other things, the regression of the müllerian ducts and the development of the wolffian ducts, which leads the sexual development of the female calf in a masculine direction. The variation in the degree of masculinisation of the reproductive organs found in freemartins depends on how early the vascular anastomoses are established and thus at what stage in the sex development the male hormones are transferred to the female.

Twinning in cattle are mostly due to multiple ovulations, a phenomenon shown to be associated with high milk yields in dairy cows. An increased steroid metabolism, associated with higher milk yield and feed consumption in dairy cows, may cause hormonal changes leading to increased incidence of multiple ovulations.

In about 10% of the cases of heterosexual dizygotic twin pregnancy in cattle, the female calf is fertile, which may be due, among other things, to the fact that vascular anastomoses have never been established between the fetuses and the fetuses have therefore not shared a common circulation. Animal owners tend to cull female calves twinborn with a male calf because of the assumption that they are sterile and the lack of practically useful diagnostic methods for identifying freemartins. As a result, economic and genetic losses occur for the animal owners and therefor there is an increased need of practically useful methods for the diagnosis of freemartinism. More research is required for the development of an effective, fast and safe diagnostic method the animal owners can use.

INLEDNING

Freemartin-syndromet står för den vanligaste formen av intersexualitet hos nötkreatur (Padula, 2005). En freemartinkviga är en steril honkalv som är tvillingfödd med en hankalv. Detta fenomen förekommer framförallt hos nöt, men det kan även ses hos andra arter såsom får, där är det dock inte lika vanligt. Vaskulära anastomoser uppstår mellan fosterhinnorna vilket leder till att både hormoner som hankalven producerar och XY-celler överförs till honkalven via delad cirkulation och därmed inhiberas den normala honliga könsutvecklingen på olika sätt.

Tvillingdräktigheter med två foster av motsatt kön kan genomgå utan uppkomsten av en freemartin (Lillie, 1917). Detta antas bero på att de vaskulära anastomoserna mellan fostren inte bildats, alternativt bildats för sent för att hinna påverka den normala embryonala könsutvecklingen.

Det föds därmed en viss andel fertila ”freemartinkvigor” som vanligen avlivs i tron att de är sterila, vilket leder till ekonomiska och genetiska förluster för dagens djurägare (Qiu *et al.*, 2018). Effektivare och mer exakta diagnostiska möjligheter är därigenom nödvändiga för att reducera dessa förluster.

Syftet med denna uppsats är att undersöka den normala könsutvecklingen, hos framförallt den honliga kalven, jämfört med den som uppstår vid freemartinism. Anatomiska skillnader mellan freemartinfoster/kvigor och normala honliga respektive hanliga individer samt vilka faktorer som ligger bakom freemartinism kommer att belysas.

MATERIAL OCH METODER

Materialet till denna uppsats har samlats in genom sökningar efter vetenskapliga artiklar i Web of Science, PubMed och Google Scholar. Sökord som använts var freemartin OR free-martin, cow* OR cattle OR bovine samt chimerism OR chimera. Utöver detta har även diverse artiklars referenslistor använts.

Den grundläggande anatomin, den tidiga embryonala utvecklingen samt huvuddelen av beskrivningen av den normala könsutvecklingen har skrivits med hjälp av läroböcker (Hyttel, 2010; König *et al.*, 2014; Sjaastad *et al.*, 2016; McGeary *et al.*, 2017; Sadler *et al.*, 2017).

LITTERATURÖVERSIKT

Kons reproduktionsorgan (se figur 1 och 2)

Ovarium

Kon har två äggstockar som är lokaliserade nära den laterala bukväggen, kranialt om bäckeninloppet på respektive sida. Äggstockarna har elliptisk form och är cirka 4-6 cm långa.

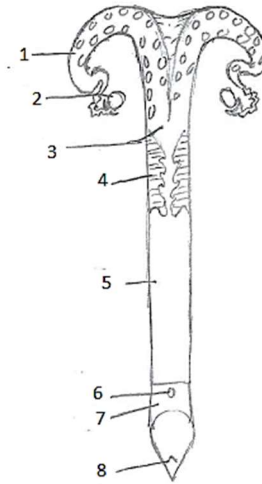
Äggstockarna består till stor del av bindväv som är väl kärlförsörjd. Inbäddade i bindväven finns en mängd strukturer kallade folliklar eller äggblåsor, var och en av dessa innehåller en oocyt. Om ovulation har skett kan även gulkroppar ses i äggstockarna. Utöver funktionen att producera oocyter så tillverkar äggstockarna även könshormoner så som östrogen och progesteron.

Tuba uterina

Äggledarens funktion är att transportera oocyten från äggstocken till livmodern. Äggledaren kan delas in i tre delar: infundibulum, ampulla och isthmus. Den första delen, infundibulum, är trattliknande och omsluter delvis äggstocken. Här finns fingerlika utskott kallade fimbriae, vars uppgift är att fånga upp oocyten och leda den vidare ner i äggledaren. I ampulla sker vanligen själva befruktningen och isthmus är den sista delen som ansluter till livmodern. Hos nöt är äggledaren generellt ca 15–30 cm lång.

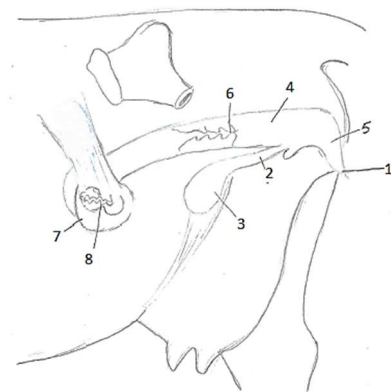
Uterus och cervix

Kons livmoder består av en relativt liten kropp och två horn. Hornen ringlar sig ventralt runt sig själva och den första utbuktningen är vänd dorsokranialt. Utvärtes verkar livmoderkroppen till synes väldigt lång, men det är de kaudala delarna av hornen som är omslutna av en gemensam serös och muskulär hinna. Livmoderns funktion är att transportera sperma till äggledarna, skydda och tillföra fostret näring, avlägsna restprodukter, transportera fostret ut ur moderns kropp vid förlossning samt ge information till resterande reproduktionssystem om dräktighetens stadium. Cervix som förbinder livmodern med vaginan, har ett smalt lumen och en tjock vägg. Väggen består till mestadels av elastiska fibrer och



Figur 1: Honliga reproduktionsorgan hos nöt. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av König et al., (2014).

1, Livmoderhorn med karunkler; 2, Äggstock; 3, Livmoderkropp; 4, Livmoderhals; 5, Vagina; 6, Extern öppning av uretra; 7, Vestibulum; 8, Vulva med klitoris.



Figur 2: Honliga reproduktionsorganen hos nöt, vänster sidovy. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av König et al., (2014).

1, Klitoris; 2, Uretra; 3, Urinblåsa; 4, Vagina; 5, Vestibulum; 6, Livmoderhals; 7, Livmoderhorn; 8, Äggstock.

glatt muskulatur. Väggen ändrar sin struktur beroende på hormonpåverkan, exempelvis förlorar den sin fasthet innan förlossning för att möjliggöra fostrets passage.

Vagina och vestibulum

Vaginan är kanalen som leder från cervix till uretras mynning. Det är det honliga organet för kopulation. Hos ko begränsar den utskjutande cervix, portio, lumen i den kraniala delen av vagina till ett ringliknande utrymme, kallat fornix. Vestibulum utgör den kaudala delen av kopulationsorganet, delen från uretras mynning till vulva.

Vulva

De externa genitalorganen består av vulva och klitoris. Vulvan består av två vertikala blygdläppar och är belägen ventralt om anus. Blygdläpparna är vanligtvis tätt slutna och ventralt mellan dessa sitter klitoris.

Normal könsutveckling

Vid befruktning, då antingen en X- eller Y-kromosombärande spermie fuserar med en oocyt, fastställs det genetiska könet. Huruvida fostret senare utvecklar testiklar eller äggstockar avgörs av närvaron av en gen på Y-kromosomen, kallad SRY-genen. Den kodar för ett protein, så kallat testical-determining factor, vilken är nödvändig för att gonaderna ska utvecklas till testiklar. Genetiska honor (XX) saknar Y-kromosomen och således SRY-genen, vilket leder till att gonaderna istället utvecklas till äggstockar.

Under gastrulationen övergår embryonalplattan från att vara didermisk till att bestå av tre groddblad;ektoderm, mesoderm och endoderm. Under denna process förlorar de flesta celler sin pluripotens, vilket är förmågan att utvecklas till alla celltyper hos djuret. Gonocyterna bibehåller dock sin pluripotens. De får sin identitet redan i epiblasten och förflyttar sig därifrån via intraembryonalt endoderm till det visceral mesodermet som omger gulsäcken.

Gonader framträder till en början som två longitudinella könslistor i det intermediära mesodermet. De formas genom proliferation av epitelceller och förtätning av underliggande mesenkym. Från könslistorna formas från början både de wolffska och de müllerska gångarna. Beroende på genetiskt kön så kommer en av dessa gångar under könsutvecklingen att utvecklas medan den andra degenererar. I detta stadium är det omöjligt att avgöra embryots kön och därav befinner sig gonaderna i ett indifferent stadium.

Runt dag 25 hos nöt anländer gonocyterna, genom migration, från det visceral mesodermet som omger gulsäcken till könslistorna. Dessa könsceller kommer så småningom att bilda spermier alternativt oocyter. Närvaron av de primitiva könscellerna initierar differentieringen av gonaderna till antingen testiklar eller äggstockar.

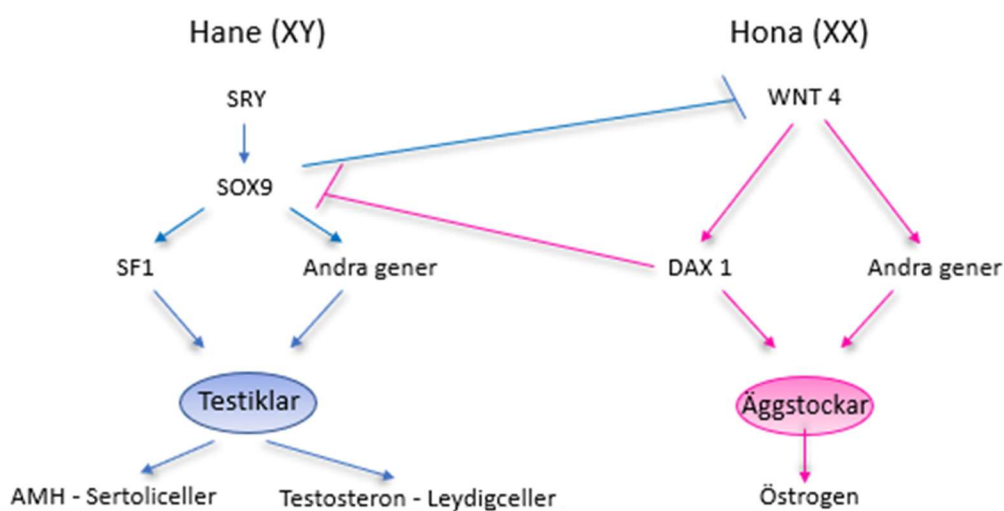
Utvecklingen av sekundära reproduktionsorgan så som de yttre könsorganen samt honliga och hanliga gångsystem styrs i nästa steg av om gonaderna utvecklas till testiklar alternativt äggstockar och det är denna utveckling som fastställer embryots kön.

Hanlig utveckling

Generna SOX9 och WNT4 finns båda uttryckta i könslisterna då gonaderna befinner sig i ett indifferent stadium. Om embryot är genetiskt hanligt så kommer de primitiva könscellerna att bära på ett XY-komplex. Y-kromosomen bär på SRY-genen och uttrycket av denna gen kommer att uppreglera SOX9 och inhibera WNT4, vilket aktiverar uttrycket av en annan gen, SF1. Uttrycket av SF1 leder till att somatiska celler i gonaderna kommer att differentieras till sertoliceller och i mesenkymet mellan testikelsträngarna utvecklas den första generationen av androgenproducerande leydigceller. Hos nöt sker detta runt dag 42. I figur 3 ses schematiskt hur de olika generna ansvarar för differentieringen av testiklar respektive äggstockar.

Leydigcellerna producerar testosteron som influerar de wolffska gångarna att utvecklas vidare till de inre hanliga reproduktionsorganen i form av bitestiklar, sädesledare, ductuli efferentes och sädesblåsor. Testosteron omvandlas även till dihydrotestosteron som medierar bildningen av de yttre könsorganen till penis och scrotum samt testiklarnas nedvandring från bukhålan, via inguinalkanalen till scrotum.

Förutom testosteron producerar testikelvävnaden även AMH (Anti-Müllerian Hormone), vilket är ett hormon som orsakar tillbakabildningen av de müllerska gångarna hos det hanliga fostret (Rota *et al.*, 2002). AMH är ett glykoprotein som hos hanar produceras av sertoliceller, från den tidiga könsutvecklingen till och med könsmognad (Bézard *et al.*, 1988). Närvaron av dessa två hormoner är nödvändig för en hanlig könsutveckling.



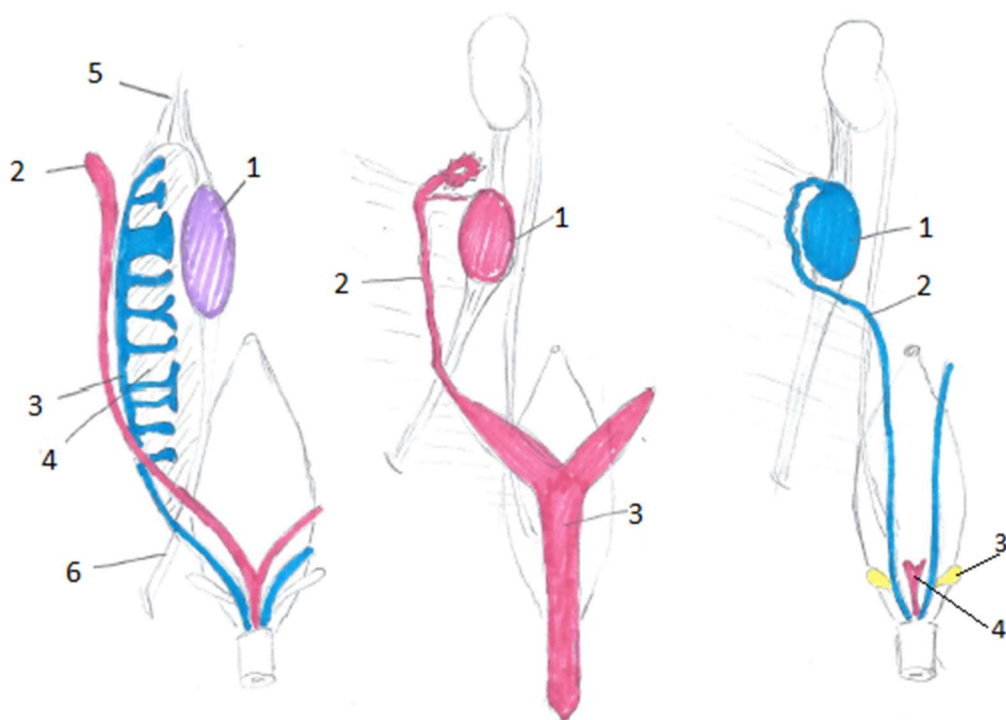
Figur 3: Schematisk bild över hur gener påverkar differentiering av testiklar respektive äggstockar. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av Sadler *et al.* (2017).

Honlig utveckling

Avsaknaden av Y-kromosomen och således SRY-genen leder till att WNT4 inte inhiberas, vilket gör att den nukleära receptorn DAX1 uppregleras och den, i sin tur, leder till inhibering av SOX9. WNT4 reglerar även andra gener som ansvarar för differentieringen till äggstockar men dessa gener har inte identifierats. Hos nöt sker detta runt dag 50-60.

Avsaknaden av testosteron leder till att de wolffska gångarna degenererar, medan avsaknaden av AMH i ett tidigt stadium, tillsammans med närvaron av östrogen, leder till att de müllerska gångarna kan utvecklas vidare till de inre honliga reproduktionsorganen bestående av äggledare, livmoder, livmoderhals och vagina. Östrogen stimulerar även bildningen av de yttre honliga könsorganen såsom klitoris, vulva och kaudala delen av vagina. Nedan, i figur 4, ses en schematisk bild av det indifferentia stadiet i könsutvecklingen jämfört med de honliga och hanliga differentierade stadierna.

Hos honor produceras också AMH men av granulosa-celler i äggstockarna (Bézar *et al.*, 1988). Detta sker dock senare under fostertiden, då de müllerska gångarna inte längre påverkas av hormonet (Teixeira *et al.*, 2001).



Figur 4: En schematisk jämförelse mellan det indifferentia stadiet i den embryonal könsutveckling (A) med de differentierade honliga (B) respektive hanliga (C) stadierna. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av König *et al.*, (2014).

A: 1, Gonad; 2, Müllersk gång; 3, Wolffsk gång; 4, Mesonefros; 5, Kraniala gonadligamentet; 6, Kaudala gonadligamentet. B: 1, Äggstock; 2, Livmoderhorn; 3, Livmoder. C: 1, Testikel; 2, Sadesledare; 3, Sadesblåsor; 4, Rest av müllerska gångarna.

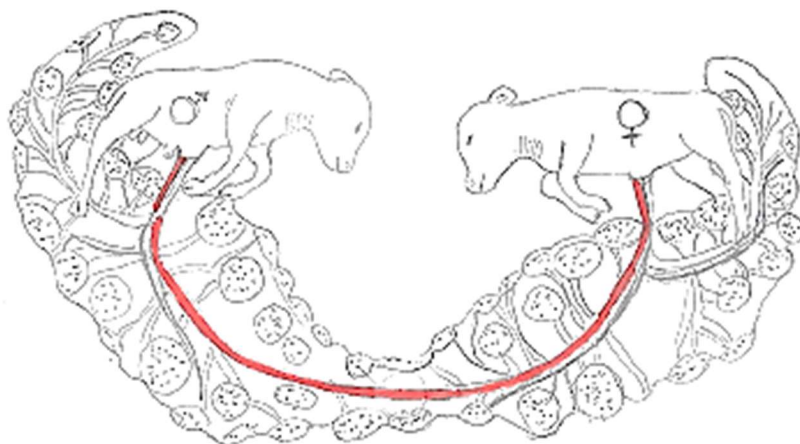
Freemartinism

Definition

Freemartinism står för den vanligaste formen av intersexualitet hos nötkreatur (Padula, 2005). En freemartinkviga kan generellt definieras som en steril honkalv, tvillingfödd med en hane. Honkalven är även chimär (XX/XY), vilket definieras som ett djur vars kropp innehåller celler med ursprung från olika zygoter (Blood *et al.*, 2007). Hos dessa hondjur är de inre reproduktionsorganen av övervägande hanlig karaktär medan de yttre reproduktionsorganen vanligen är av mer honlig karaktär, men det finns variationer (Lillie, 1917). En freemartinkviga uppstår vid dräktighet med tvåäggstvillingar av motsatt kön då utvecklingen av honkalvens reproduktionsorgan modifieras, till följd av påverkan av könshormoner från den hanliga kalven.

Uppkomst

För att freemartinism ska uppstå krävs tre förutsättningar, en dräktighet med tvåäggstvillingar och att fostren är av motsatt kön samt en gemensam cirkulation genom bildning av vaskulära anastomoser mellan fosterhinnorna (Zhang *et al.*, 1994). Dessa vaskulära anastomoser (se figur 5) bildas sekundärt till en fusion av tvillingarnas respektive korionhinna (Lillie, 1917). I den tidiga embryonala utvecklingen sker det normalt en förlängning av blastocysten, den växer ut som en strängliknande säck i det ena livmoderhornets lumen och vidare ut i det motsatta hornet. Denna förlängning går snabbt, inom ca 18 dagar, och är en förutsättning för att korionhinnorna vid tvillingdräktighet kan överlappa varandra och på så sätt genomgå en fusion. Vaskulära anastomoser är sedan möjliga när de två allantoishinnorna möts, eller tidigare när allantois genomgår fusion med korionhinnan, eftersom blodkärlen i allantoishinnans viscerala mesoderm tenderar att sprida sig även utanför området för själva fusionen.



Figur 5: Schematisk bild över vaskulära anastomoser mellan fostren under tvillingdräktighet hos nötkreatur. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av Lillie, (1917). Honkalv till höger i bild och hankalv till vänster.

I fall med tvillingdräktighet där fostren är av motsatt kön, och där honkalven har visats vara fertil samt haft normalt utvecklade reproduktionsorgan, har anastomoser inte påvisats vilket styrker att en gemensam cirkulation samt hormonell påverkan från hankalven är en förutsättning för freemartinism (Lillie, 1917).

Varför det är just honan som blir mest påverkad hormonellt vid tvillingdräktighet beror på att den embryonala könsutvecklingen hos hanar börjar tidigare än hos honor (Lillie, 1917). Första stegen av könsutvecklingen börjar ungefär runt dag 42 hos handjuren, jämfört med dag 50-60 hos hondjuren. Testikeln har ett försprång med bildning av interstitiell vävnad och därmed hormonproduktion jämfört med äggstockarna, vilket vid delad cirkulation leder till en hämning av de honliga reproduktionsorganens utveckling.

AMH har visats vara den främsta anledningen till att freemartinism uppstår hos nötkreatur (Josso *et al.*, 1998). AMH påverkar gonaderna hos freemartinfostret genom att vid tiden för honlig könsutveckling störa så att syntesen av östrogen som observeras hos normala honor istället växlar över till syntes av androgener (Mendes, 2012). Vid exponering av AMH i gonaderna hos honkalven ses även differentiering av epitelceller till sertoliliknande celler. Degenerationen av de müllerska gångarna börjar runt dag 55 hos både hankalven och freemartinfostret.

I en studie jämförde man nivåerna av tre olika hormoner i plasma, taget från freemartinkvigor och från normala honliga respektive hanliga nötkreatur (Rota *et al.*, 2002). Hormonerna som kontrollerades var testosteron, progesteron och AMH. Resultaten visade att testosteron följde ett mönster med ökande nivåer hos hanar, från 1 ng/ml vid 5 månaders ålder till över 3 ng/ml vid 10 månaders ålder. Vid samma åldrar hos honor samt freemartinkvigor låg nivåerna hela tiden under 0,4 ng/ml i plasma.

Nivåerna för progesteron låg under 0,4 ng/ml, vid alla provtagna åldrar både hos freemartinkvigor och normala honor (Rota *et al.*, 2002). Nivåerna skiljde sig först vid könsmognad, då de normala honorna började få cykliska värden.

Vid födseln hade freemartinkvigor och hankalvar väldigt höga nivåer av AMH, runt 700 ng/ml i plasma, jämfört med nyfödda honor som alla låg under 120 ng/ml (Rota *et al.*, 2002). Därefter var koncentrationen av AMH i plasma hos honor stabil under det första året, runt 90 ng/ml, medan hanar nådde ett maxvärde vid ungefär 1000 ng/ml, efter 5 månader, och därefter sjönk nivån till runt 200 ng/ml efter 9 månader. Hos freemartinkvigor sjönk de höga koncentrationerna av AMH, som sågs vid födseln, snabbt ner till <200 ng/ml under första levnadsveckan. Efter 9 dagar syntes ingen signifikant skillnad mellan freemartinkvigor och vanliga honor. Den snabba sänkningen av AMH-koncentration hos freemartinkvigor efter födseln indikerar avsaknad av funktionell testikelvävnad, vilket tyder på att AMH ursprungligen härstammar från tvillinghanen vilket stämmer väl överens med den kraftiga sänkning man ser hos unga tjurar som kastreras.

Anatomiska förändringar

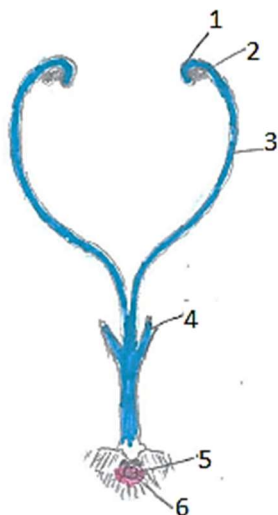
Hos hankalven börjar differentieringen av testiklarna cirka dag 42 och ungefär en vecka senare kan ingen signifikant skillnad mellan freemartinfoster och normala honor påvisas (Jost *et al.*, 1972). Under nästkommande två veckor är det däremot möjligt att identifiera freemartin-foster. Först sker en inhibering av äggstockarnas samt de müllerska gångarnas utveckling, medan maskulinisering av resterande könskaraktärer inte sker förrän dag 60.

Honkalven som under tvillingdräktighet exponeras för AMH uppvisar dvärgväxt av äggstockarna och utvecklar olika grader av maskulinitet av de inre reproduktionsorganen, inkluderat hypoplasi av livmoder och vagina (Vigier *et al.*, 1988). Gonaderna hos runt 80 dagar gamla freemartinfoster liknar mer små testiklar än äggstockar och uppvisar testikelgångar, leydig-liknande celler samt välutvecklad tunica albuginea (Dominguez *et al.*, 1990). I den studien, där man tittade på gonaderna hos freemartinfoster som var 50 dagar eller äldre jämfört med en kontrollgrupp, uppvisades att gonaderna hos freemartinfoster var mindre. Detta stöds av tidigare forskning där ett avbrott i tillväxt av gonaderna observerades runt dag 48 hos freemartinfoster (Jost *et al.*, 1972).

Några andra anatomiska förändringar som ses hos freemartinfoster är degeneration av de müllerska gångarna, precis som hos hanar, men man ser samtidigt tecken på att de har utvecklats som hos honor i olika grad innan degeneration initierats (Bissonnette, 1924). Bildning av de wolffska gångarna kan ses som hos hanar men i kombination med en tidigt ofullständig degeneration som hos honor. I en studie där man tittade på 25 freemartinfoster som var 84 dagar eller äldre kunde bilateral utväxt av processus vaginalis, vilket är en utbuktning från parietala peritoneum mot inguinalkanalen, lätt identifieras (Schoot *et al.*, 1995).

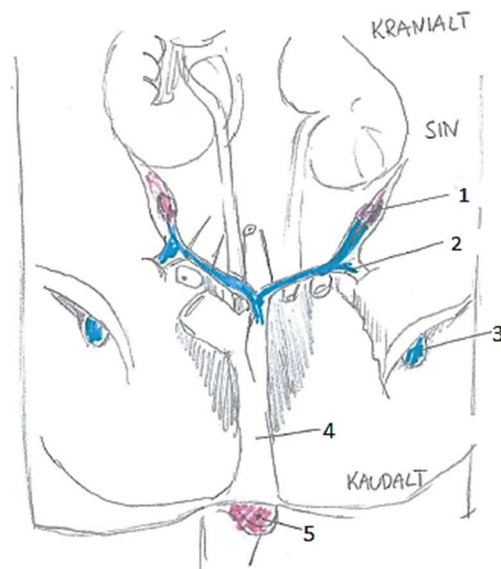
Livmoderhalsen är sällan närvarande alternativt underutvecklad hos en freemartinkviga, sädesblåsor ses ofta medan närvaro av prostata är mer ovanligt (Mendes, 2012). Det är vanligt att äggledare inte hittas vid morfologisk undersökning. I vissa fall, där reproduktionsorganen hos freemartinfoster genomgått en hög grad av maskulinisering, kan gonaderna hittas i inguinalområdet men det är vanligare att de är placerade i buken, där äggstockarna normalt är lokaliserade.

Graden av maskulinisering av de inre reproduktionsorganen hos freemartinkvigor varierar mellan individer (Lillie, 1917). Nedan ses två fall av freemartinism (figur 6-7) som beskrivits av Lillie (1917) vilka kan jämföras med figurerna 8 och 9 där normala hanliga och honliga reproduktionsorgan hos foster kan ses. I figur 6 ses organ där en i stort sett komplett maskulinisering av de inre reproduktionsorganen hos en freemartinkviga har skett. Vulvan är normal och leder in till ett kort urogenitalsinus. Bortom det finns inga spår av vagina, livmoder eller livmoderhorn. Från urogenitalsinus avgår de wolffska gångarna och lateralt om dessa syns sädesblåsor. Gonaderna är små och testikelliknande med ett bitestikelliknande organ anslutet till sig samt en komplett avsaknad av äggstocksbark har påvisats histologiskt. De müllerska gångarna har degenererat fullständigt. De yttre könsorganen har ett i stort sett normalt honligt utseende, förutom en lätt hypertrofi av klitoris.



Figur 6: Reproduktionsorganen hos en 7 veckor gammal freemartinkviga. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av Lillie (1917).

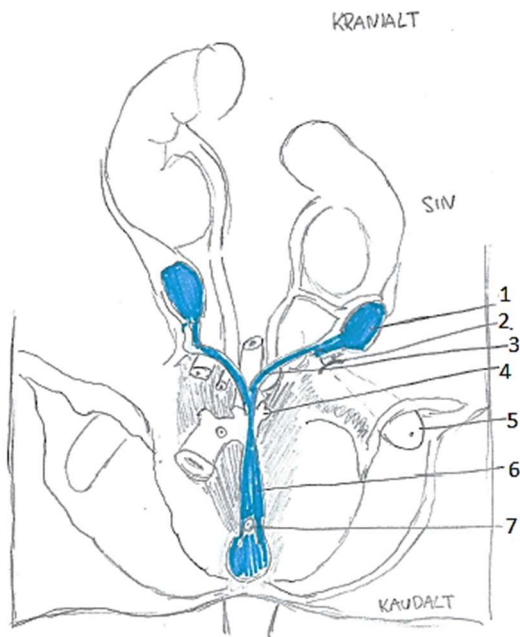
1, Bitestikelliknande organ; 2, Testikelliknande gonad; 3, Wolffsk gång; 4, Sädesblåsa; 5, Klitoris



Figur 7: Sterilt freemartinfoster 16,3 cm. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av Lillie (1917).

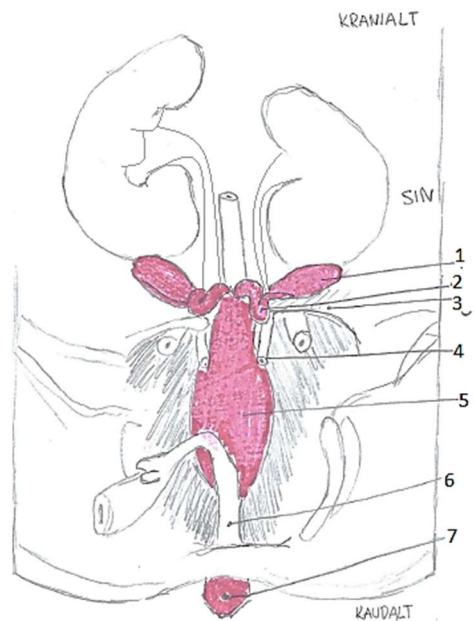
1, Gonad; 2, Wolffsk gång; 3, Gubernaculum; 4, Urogenitalsinus; 5, Klitoris.

I figur 7 ses ett fall av freemartinism där maskulinisering inte är fullt så komplett. Gonaderna är mindre än normalt, vilket är framträdande. Gubernacula har ersatt *ligamentum teres uteri* och de müllerska gångarna är underutvecklade men inte fullständigt degenererade. Bildning av sädesblåsor har inte skett till skillnad från fallet i figur 6. Det syns en tydlig skillnad i bildningen av gångsystemen hos det normala honliga fostret jämfört med detta fall av freemartinism.



Figur 8: Reproduktionsorgan hos normalt hanfoster på 15,8 cm. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av Lillie (1917).

1, Testikel; 2, Saccus vaginalis; 3, Wolffsk gång; 4, Sädesblåsa; 5, Gubernaculum; 6, Urogenitalsinus; 7, Penisroten.



Figur 9: Reproduktionsorgan hos normalt honfoster på 20 cm. Bild av Amanda Hammarström modifierad efter original av Lillie (1917).

1, Äggstock; 2, Livmoderhorn; 3, Ligamentum teres uteri; 4, Ureter; 5, Vagina; 6, Urogenitalsinus; 7, Klitoris.

De yttre könsorganen hos freemartinkvigor har oftast ett normalt honligt utseende, men variationer finns (Mendes, 2012). De mest frekventa avvikelserna som ses är en förstorad klitoris tillsammans med en liten vulva och en framträdande tofs av hår. Det är generellt accepterat att hos de flesta freemartinkvigor är vaginan kortare än hos normala honor och den slutar ofta blint oberoende av utvecklingen av livmodern. Hos vuxna freemartinkvigor är vaginans längd endast 8-10 cm medan den hos normala kvigor mäter upp till 30 cm.

Den stora variationen inom freemartinism när det gäller graden av maskulinisering av de inre reproduktionsorganen verkar vara relaterad till hur tidigt de vaskulära anastomoserna uppstår under den embryonala utvecklingen, vilket tillåter de hanliga hormonerna AMH och testosteron att påverka könsutvecklingen hos honkalven i olika hög grad (Peretti *et al.*, 2008). Denna förklaring diskuterades redan av Lillie, (1917) och har även accepterats av andra som studerat freemartinism så som Chapin, (1917) och Bissonette, (1924).

Effekter på hankalven

Under fostertiden leder den gemensamma cirkulationen till chimerism hos båda fostren (Padula, 2005). Det finns två effekter relaterat till tjurar som är av speciellt intresse, fertilitet samt könsfördelning hos avkomman. Närvaro av XX-celler bland tjurarnas lymfocyter har väckt förslag till att det skulle kunna leda till en större andel honlig avkomma från dessa tjurar. Enligt Padula (2005) har dock en litteraturgenomgång av Long (1979) avseende könsfördelningen inte hittat grund för ett samband mellan chimera-tjurar och ett högre antal honlig avkomma.

I en studie med 22 tjurar som var tvillingfödda med en freemartinkviga, påvisades chimerism, XX/XY i lymfocyterna, hos 12 av dessa tjurar, med hjälp av karyotypning (Dunn *et al.*, 1979). En högre andel av dessa, 7 av 12, avlivades på grund av låg fertilitet jämfört med en avlivningsfrekvens på endast 7 av 128 hos kontrollerna. Spermieabnormaliteter samt testikulär degeneration påvisades också hos dessa tjurar genom histologisk utvärdering.

Baserat på denna studie med 12 chimeriska tjurar och 128 kontroller, visades en 58 %risk att en chimerisk tjur avlivs på grund av låg fertilitet inom sina 10 första levnadsår jämfört med endast 5 % risk för en ensamfödd icke-chimerisk tjur (Dunn *et al.*, 1979).

I en annan studie, där fyra av 300 tjurar identifierades med chimerism genom karyotypning, sågs dock inga samband med lägre fertilitet (Padula, 2005). Senare litteratur nämner att könsutvecklingen och fertiliteten hos chimära tjurar oftast är opåverkad (Szczerbal & Switonski, 2016).

Multipla ovulationer och mjölkavkastning

Tvillingdräktigheter hos mjölkkor är oönskade då de reducerar den reproduktiva effektiviteten och djurägarens lönsamhet (Lopez *et al.*, 2005). I studien av Lopez *et al.* undersöktes sambandet mellan multipla ovulationer och en hög mjölkavkastning hos kor. De använde sig av 267 mjölkkor och visade att frekvensen av multipla ovulationer var 1,6 %, 16,9 % och 47,7 % för ovulationer hos korna som respektive producerade ≤ 35 , ≤ 45 och ≥ 45 kg mjölk/dygn. Generellt sågs ett samband mellan hög mjölkavkastning och multipla ovulationer.

Mekanismerna bakom ovulationsfrekvensen hos nöt under normala förhållanden är inte fastställda (Lopez *et al.*, 2005). Observationer har dock visat hormonella skillnader mellan kor med multipla ovulationer och kor med en ovulation per cykel. Hos kor med multipla ovulationer sågs lägre nivåer av progesteron samt högre nivåer av follikelstimulerande hormon (FSH), luteiniserande hormon (LH) och östrogen. Författarna diskuterar att lägre nivåer av cirkulerande progesteron under utvecklingen av den preovulatoriska vågen kan leda till ökade nivåer av FSH och LH, vilket i sin tur kan leda till ökat antal multipla ovulationer.

Hos kor med hög mjölkavkastning sågs låga koncentrationer av cirkulerande progesteron, vilket antas bero på en ökad steroidmetabolism som är associerad med hög mjölkproduktion och en hög foderförbrukning (Lopez *et al.*, 2005). Baserat på sambandet mellan hög mjölkavkastning och multipla ovulationer som observerats i denna studie kan det antas att frekvensen av

tvillingdräktigheter hos nöt kommer att fortsätta öka tillsammans med allt högre mjölkproduktion.

En ökad frekvens av tvillingfödselar i korrelation till mjölkavkastning hos nöt styrks av en studie i Polen, där man observerat en ökning mellan åren 2005 och 2013 (Szczerbal *et al.*, 2014). Studien påvisade att medelavkastningen av mjölk ökade från 9 700 kg år 2005 till 11 500 kg år 2013 och i denna population ökade tvillingfrekvensen under samma period från 1,5 % år 2005 till 5,9 % år 2013.

Behov av diagnostiska metoder

Förekomsten av freemartinkvigor förutsätter förekomsten av tvillingdräktigheter hos nöt. Vid tvillingdräktigheter där fostren är av motsatt kön så har det observerats att majoriteten, 82-97 % av de honliga kalvarna är freemartinkvigor samt chimära, XX/XY (Qiu *et al.*, 2018). Chimerism i detta fall innebär att XY-celler från det hanliga fostret överförs till den honliga tvillingen via vaskulära anastomoser och resulterar i en XX/XY-chimär vilket tillsammans med den hormonella påverkan bidrar till inhiberingen av den normala honliga könsutvecklingen (Peretti *et al.*, 2008).

Cirka 10 % av honliga kalvar födda som tvillingar till hanliga kalvar har dock visats sig vara fertila (Qiu *et al.*, 2018). Djurägarna tenderar att avliva alla freemartinkvigor redan innan de vet om de är fertila, i brist på effektiva och praktiska diagnostiska alternativ, vilket leder till både ekonomiska och genetiska förluster inom såväl mjölk- som köttindustrin.

Behovet av tillförlitliga och inte alltför dyra diagnostiska metoder för att identifiera freemartinkvigor vid födseln eller tidigare har blivit av allt större betydelse för att reducera onödiga ekonomiska förluster samt bevara viktigt genetiskt material (Biswas *et al.*, 2015). Många diagnostiska metoder har etablerats för att identifiera freemartinism, däribland klinisk undersökning inkluderande mätning av vaginans längd (Khan & Foley, 1994), karyotypning för XX/XY-chimärer (Dunn *et al.*, 1981), PCR för att detektera specifika segment på Y-kromosomen (Hirayama *et al.*, 2007) samt kvantitativ detektion av hormoner som AMH, progesteron och östrogen (Rota *et al.*, 2002).

Identifikation av freemartinkvigor genom klinisk undersökning baseras på två kliniska tecken som oftast ses hos freemartinkvigor, en vagina som är kortare än en normal samt närvaron av sädesblåsor, vilka kan mätas och palperas (Mendes, 2012). Fördelen med denna metod är att den är enkel, snabb och billig jämfört med laborietester men då inte alla freemartinkvigor har en kortare vagina så är det inte ett 100 % pålitligt test.

Majoriteten av resterande metoder är baserade på antagandet att freemartinkvigor är chimärer (XX/XY), och att fertila honor tvillingfödda med en hane inte är chimärer (Qiu *et al.*, 2018). Det har dock påvisats tre fall med freemartinkvigor där chimerism detekterats och de har ändå varit fertila (Fujishiro *et al.*, 1995). Fertila chimära freemartinkvigor skulle kunna vara ett tillfälligt fenomen men det har inspirerat till utveckling av mer exakt och effektiv diagnostik

för att identifiera fertila honor, tvillingfödda med en hankalv, vilket kan underlätta för djurägarna vid selektion av kvigor (Qiu *et al.*, 2018).

En studie av Qiu *et al.*, (2018) har visat att en kvantifiering av SRY-genen genom qPCR är en effektivare detektionsmetod för diagnos av freemartinkvigor jämfört med exempelvis PCR. Blodprov från freemartinkvigor innehöll en relativt hög halt av SRY medan halten av SRY hos fertila honkalvar tvillingfödda med en hankalv var relativt låg. Resultaten från denna studie indikerar att låga halter av SRY inte påverkar fertiliteten hos honkalvar tvillingfödda med en hankalv. Det krävs dock fortsatt forskning för att bekräfta detta samt för att utveckla en praktiskt användbar metod för identifiering av freemartinkvigor.

DISKUSSION

Syftet med detta arbete var framförallt att undersöka den normala honliga könsutvecklingen och jämföra den med den könsutveckling som sker hos freemartinfoster vilka är tvillingar med en hankalv, samt vilka anatomiska skillnader man kan se mellan dessa. Effekter på hankalven vid freemartinism belystes också.

Sammanfattningsvis kan sägas att för att den normala honliga könsutvecklingen ska inhiberas och en freemartinkviga skapas krävs en tvillingdräktighet där fostren är av motsatt kön och vaskulära anastomoser måste etableras mellan fosterhinnorna så att de hanliga könshormonen kan överföras från hankalven till honkalven via den gemensamma cirkulationen (Padula, 2005). Tidpunkten för etablering av kontakt och därmed tiden för när AMH och testosteron från det hanliga fostret kan överföras och ha sin verkan på den honliga könsutvecklingen är av vikt för graden av maskulinisering av reproduktionsorganen som sker hos honan.

Den hanliga könsutvecklingen initieras runt dag 42 hos nöt och beror på närvaron av SRY-genen på Y-kromosomen, vilket senare leder till produktion av de hanliga könshormonerna AMH, testosteron och dihydrotestosteron (Hyttel, 2010). Den honliga könsutvecklingen initieras istället av frånvaron av SRY-genen, vilket tillåter andra gener att i ett senare stadium, runt dag 50-60 hos nöt, initiera gonadernas differentiering till äggstockar istället för testiklar (Jost *et al.*, 1972).

Vid freemartinism störs den normala könsutvecklingen hos den honliga tvillingen genom påverkan från framförallt hanliga könshormoner som överförs via den gemensamma cirkulationen under fostertiden. XY-celler överförs också, vilket resulterar i chimära freemartinfoster men i en studie där man undersökte sambandet mellan graden av hanligt modifierade reproduktionsorgan hos freemartinfoster och procenten av XX/XY-celler fann man ingen korrelation (Peretti *et al.*, 2008). Den hormonella påverkan verkar därmed spela störst roll vid inhiberingen samt modifieringen av de honliga reproduktionsorganen.

Den normala honliga könsutvecklingen inhiberas därmed främst, till olika grad hos freemartinfoster, till följd av exponering för AMH och testosteron (Josso *et al.*, 1998). Östrogenproduktionen hämmas och istället sker en ackumulation av hanliga könshormoner (Mendes, 2012). Bildning av äggstocksbarken inhiberas istället för att proliferera, som hos den

normala honan, vilket leder till gonadernas reducerade storlek som ses hos freemartinfoster (Jost *et al.*, 1972). AMH influerar de müllerska gångarna att tillbakabildas och testosteron påverkar de wolffska gångarna att utvecklas, vilket leder till en maskulinisering av de honliga reproduktionsorganen.

När det kommer till de anatomiska förändringarna av de honliga reproduktionsorganen hos freemartinfoster och -kvingor ses en bred variation i graden av maskulinisering, från nästintill komplett maskulinisering till i princip normala honliga reproduktionsorgan (Lillie, 1917). Detta antas bero på när de vaskulära anastomoserna etableras och därmed under vilket stadium den normala honliga könsutvecklingen blir störd av hanliga könshormon. Även om variationen är bred finns det en del generellt accepterade förändringar som drabbar de flesta freemartinfoster, bland dessa kan nämnas förminskade gonader, degenererade müllerska gångar i olika grad, kortare vagina som slutar blint, en livmoderhals som sällan är närvarande alternativt degenererad, närvaro av sädesblåsor och klitoris är ofta förstörad.

Effekterna på hankalven i sin tur verkar för det mesta vara försumbara, en del studier visar att XX-chimära tjurar har lägre fertilitet medan andra inte uppvisar något signifikant samband mellan lägre fertilitet och XX-chimärer enligt sammanfattning av Padula (2005) och en studie av Szczerbal och Switonski (2016). Chimerism är detekterat hos tjurar men vilka reproduktiva effekter det har är inte fullständigt fastställt, här behövs fler studier för att avgöra vilken inverkan freemartinism har på hankalven.

Det är allmänt känt att högproducerande djur ofta lider av fertilitetsproblem. Det har dock påvisats samband mellan hög mjölkavkastning och multipla ovulationer (Lopez *et al.*, 2015). Mer forskning inom detta område krävs men enligt Lopez *et al.* kan det antas att den höga steroidmetabolism som ses hos högproducerande djur skulle kunna förorsaka en hormonell rubbning som i sin tur orsakar multipla ovulationer hos korna. Baserat på detta samband kan man anta att frekvensen av tvillingdräktigheter hos mjölkkor kan komma att öka, då man ofta strävar efter fler höglakterande djur för ekonomisk vinning, ett samband som visats av Szczerbal *et al.* (2016). Tvillingdräktigheter hos nöt är dock inte önskvärt eftersom det enligt Mendes (2012) bland annat kan predisponera för förlossningssvårigheter, vilket jag tänker i sin tur skulle kunna leda till en ökad dödlighet eller prematura födselar och därmed ekonomiska förluster.

Freemartinism leder också till ekonomiska förluster då freemartinkvingor oftast avlivs, i tron att de är sterila, trots att det visats att cirka 10 % av de hankalvar som tvillingföddes med en hankalv faktiskt är fertila (Qiu *et al.*, 2018). Det föreligger en brist på säkra och praktiskt användbara diagnostiska metoder för att undvika både ekonomiska och genetiska förluster (Biswas *et al.*, 2015). Det har utformats en hel del diagnostiska metoder för att identifiera freemartinfoster och kvingor men ingen metod är helt tillfredställande. Från de studier som tagits upp i detta arbete tycker jag att en klinisk undersökning verkar vara ett bra första alternativ och i fall denna metod inte ger tydligt resultat och misstanke fortfarande kvarstår, exempelvis då kvingan är tvillingfödd till en hane, kan man gå vidare med laborietester. Mer forskning krävs dock för att utforma laborietest som är praktiskt användbara och tillförlitliga.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bézar, J., Vigier, B., Tran, D., Mauléon, P. & Josso, N. (1988). Anti-Müllerian hormone in sheep follicles. *Reproduction Nutrition Développement*, 28(4B), pp 1105–1112.
- Bissonnette, T. H. (1924). The development of the reproductive ducts and canals in the free-martin with comparison of the normal. *American Journal of Anatomy*, 33(2), pp 267–345.
- Biswas, J., Biswas, S., Pan, S. & Mandal, A. (2015). A cytogenetic study of heterosexual quadruplets of cattle (*Bos indicus*) - a case report. *Veterinarski Arhiv*, 85(1), pp 105–110.
- Blood, D. C., Studdert, V. P. & Gay, C. C. (2007). *Saunders comprehensive veterinary dictionary*. 3rd ed. Edinburgh ; New York: Elsevier Saunders. ISBN 978-0-7020-2789-5.
- Chapin, C. L. (1917). A microscopic study of the reproductive system of foetal free-martins. *Journal of Experimental Zoology*, 23(2), pp 453–482.
- Dominguez, M. M., Liptrap, R. M., Croy, B. A. & Basrur, P. K. (1990). Hormonal correlates of ovarian alterations in bovine freemartin fetuses. *Animal Reproduction Science*, 22(3), pp 181–201.
- Dunn, H. O., Johnson, J. R. & Quaas, R. L. (1981). Sample size for detection of Y-chromosomes in lymphocytes of possible freemartins. *The Cornell Veterinarian*, 71(3), pp 297–304.
- Dunn, H. O., McEntee, K., Hall, C. E., Johnson, R. H. & Stone, W. H. (1979). Cytogenetic and reproductive studies of bulls born co-twin with freemartins. *Reproduction*, 57(1), pp 21–30.
- Fujishiro, A., Kawakura, K., Miyake, Y.-I. & Kaneda, Y. (1995). A fast, convenient diagnosis of the bovine freemartin syndrome using polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 43(5), pp 883–891.
- Hirayama, H., Katagiri, S., Kageyama, S., Minamihashi, A., Moriyasu, S., Sawai, K., Onoe, S. & Takahashi, Y. (2007). Rapid sex chromosomal chimerism analysis in heterosexual twin female calves by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Animal Reproduction Science*, 101(1), pp 38–44.
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M & Betteridge, K. (2010). *Essentials of domestic animal embryology*. Edinburgh: Saunders Elsevier. ISBN 978-0-7020-2899-1.
- Josso, N., Racine, C., di Clemente, N., Rodolfo Rey & Xavier, F. (1998). The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1), pp 3–7.
- Jost, A., Vigier, B. & Prepin, J. (1972). Freemartins in cattle: The first steps of sexual organogenesis. *Reproduction*, 29(3), pp 349–379.
- Khan, M. Z. & Foley, G. L. (1994). Retrospective studies on the measurements, karyotyping and pathology of reproductive organs of bovine freemartins. *Journal of Comparative Pathology*, 110(1), pp 25–36.
- König, H. E., Aurich, C. & Liebich, H.-G. (Eds) (2014). *Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas*. 6th ed. NY: Schattauer. ISBN 978-3-7945-2833-2.
- Lillie, F. R. (1917). The free-martin; a study of the action of sex hormones in the foetal life of cattle. *Journal of Experimental Zoology*, 23(2), pp 371–452.
- Long, S.E., 1979. The fertility of bulls born twin to freemartins: a review. *Veterinary Records*. 104, 211–213.

- Lopez, H., Caraviello, D. Z., Satter, L. D., Fricke, P. M. & Wiltbank, M. C. (2005). Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(8), pp 2783–2793.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., Fitzpatrick, E. S., Ryan, M. T., Kilroy, D. & Lonergan, P. (2017). *Veterinary embryology*. Second edition. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell. ISBN 978-1-118-94061-7.
- Mendes, R. E. (Ed) (2012). *Ruminants: anatomy, behavior, and diseases*. NY: Nova Science Publishers Inc. ISBN 978-1-6208-1064-4.
- Padula, A. M. (2005). The freemartin syndrome: an update. *Animal Reproduction Science*, 87(1), pp 93–109.
- Peretti, V., Ciotola, F., Albarella, S., Paciello, O., Dario, C., Barbieri, V. & Iannuzzi, L. (2008). XX/XY Chimerism in cattle: clinical and cytogenetic studies. *Sexual Development*, 2(1), pp 24–30.
- Qiu, Q., Shao, T., He, Y., Muhammad, A.U., Cao, B. & Su, H. (2018). Applying real-time quantitative PCR to diagnosis of freemartin in Holstein cattle by quantifying SRY gene: a comparison experiment. *Peer Journal*, 6, p e4616.
- Rota, A., Ballarin, C., Vigier, B., Cozzi, B. & Rey, R. (2002). Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 129(1), pp 39–44.
- Sadler, T. W. (2015). *Langman's medical embryology*. 13th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-1-4511-4461-1.
- Schoot, P. V. D., Vigier, B., Prepin, J., Perchellet, J.-P. & Groot, A. G.-D. (1995). Development of the gubernaculum and processus vaginalis in freemartinism: Further evidence in support of a specific fetal testis hormone governing male-specific gubernacular development. *The Anatomical Record*, 241(2), pp 211–224.
- Sjaastad, O. V., Hove, K. & Sand, O. (2016). *Physiology of domestic animals*. ISBN 978-82-91743-41-7. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Szczerbal, I., Kociucka, B., Nowacka-Woszek, J., Lach, Z., Jaskowski, J. M. & Switonski, M. (2014). A high incidence of leukocyte chimerism (60,XX/60,XY) in single born heifers culled due to underdevelopment of internal reproductive tracts. *Czech Journal of Animal Science*, 59(No. 10), pp 445–449.
- Szczerbal, I. & Switonski, M. (2016). Chromosome abnormalities in domestic animals as causes of disorders of sex development or impaired fertility. *Insights from Animal Reproduction* [online],. Available from: <https://www.intechopen.com/books/insights-from-animal-reproduction/chromosome-abnormalities-in-domestic-animals-as-causes-of-disorders-of-sex-development-or-impaired-f>. [Accessed 2019-03-18].
- Teixeira, J., Maheswaran, S. & Donahoe, P. K. (2001). Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocrine Reviews*, 22(5), pp 657–674.
- Vigier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran, D., Garrigou, O., Forest, M. G. & Josso, N. (1988). Anti-müllerian hormone and freemartinism: inhibition of germ cell development and induction of

seminiferous cord-like structures in rat fetal ovaries exposed in vitro to purified bovine AMH. *Reproduction, Nutrition, Developpement*, 28(4B), pp 1113–1128.

Zhang, T., Buoën, L. C., Seguin, B. E., Ruth, G. R. & Weber, A. F. (1994). Diagnosis of freemartinism in cattle: the need for clinical and cytogenic evaluation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(10), pp 1672–1675.